

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/EP05/001252

International filing date: 08 February 2005 (08.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE

Number: 10 2004 006 249.8

Filing date: 09 February 2004 (09.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 22 April 2005 (22.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

M.04.05

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

EP05/1252

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 10 2004 006 249.8  
**Anmeldetag:** 09. Februar 2004  
**Anmelder/Inhaber:** NOXXON Pharma AG, 10589 Berlin/DE;  
SUPRAMOL Parenteral Colloids GmbH,  
61191 Rosbach/DE.  
**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von Konjugaten aus  
Polysacchariden und Polynukleotiden  
**IPC:** C 07 H, C 08 B

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 06. April 2005  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Schulz".

A handwritten stamp or signature that appears to read "Stanschus".

# BOHMANN & LOOSEN

## Anwaltsssozietät

BOHMANN & LOOSEN, Sonnenstr. 8, 80331 München

Deutsches Patent- und Markenamt

80297 München

Patentanwalt – European Patent Attorney  
Dr. Armin K. Bohmann, Dipl.-Biol.\*<sup>1</sup>

Rechtsanwalt  
Peter Loosen, LL.M.<sup>2</sup>

\* Zugelassener Vertreter vor dem Europäischen Markenamt, Alicante  
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

**Zustelladresse:**  
**Sonnenstr. 8**  
**D-80331 München**

Unser Zeichen  
Our ref

N 10040

Ihr Zeichen  
Your ref

Neuanmeldung  
(Patent)

Datum  
Date

München, 09. Februar 2004

**SUPRAMOL Parenteral Colloid GmbH, Industriestr. 1-3, 61191 Rosbach-Rodheim**  
**NOXXON Pharma AG, Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589 Berlin**

### Verfahren zur Herstellung von Konjugaten aus Polysacchariden und Polynukleotiden

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugates aus einem Polynukleotid und einem Polysaccharid sowie die nach einem derartigen Verfahren erhältlichen Konjugate.

Die Konjugation von pharmazeutischen Wirkstoffen insbesondere von Proteinen mit Polyethylenglycol-Derivaten („PEGylierung“) oder Polysacchariden wie Dextranen oder insbesondere Hydroxyethylstärke („HESylierung“) hat in den letzten Jahren mit der Zunahme an pharmazeutischen Proteinen aus der biotechnologischen Forschung an Bedeutung gewonnen.

Die Wirkungen einer PEGylierung oder HESylierung von pharmazeutisch aktiven Verbindungen wie beispielsweise Proteinen besteht unter anderem darin, dass durch eine Kopplung der Proteine an die oben angeführten Polymere wie Polyethylenglycol (PEG) oder Hydroxyethylstärke (HES) deren für die Entfaltung des vollen pharmazeutischen Potentials zu geringe kurze biologische Halbwertszeit gezielt verlängert werden kann. Durch die Kopplung können aber auch die antigenen Eigenschaften von Proteinen positiv beeinflusst werden. Im

<sup>1</sup>Sonnenstr. 8 • D-80331 München • Tel.: 089/ 51 55 64 0 • FAX: 089/ 51 55 64 13 • e-mail: BOHMANN-LAW@t-online.de

<sup>2</sup>Schaafenstr. 43 • D-50676 Köln •

Falle von anderen pharmazeutischen Wirkstoffen kann durch die Kopplung die Wasserlöslichkeit erheblich vergrößert werden. Beispiele für die HESylierung von pharmazeutischen Wirkstoffen sind beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 02/080979 A2 oder in der internationalen Patentanmeldung WO 03/000738 A2 beschrieben.

Auch neuere Entwicklungen auf dem Gebiet von biologische Zielmoleküle hochaffin bindenden Oligonukleotiden, wie beispielsweise den als Aptamere bezeichneten D-Oligonukleotide oder den als Spiegelmerre bezeichneten L-Oligonukleotide, nutzen die Möglichkeiten der Konjugation an Polymere wie Polyethylenglycol (B. Wlotzka et al. PNAS 103, Vol. 99 (2002) Seite 8898-8902), um das pharmakokinetische Profil und die Bioverfügbarkeit in vorteilhafter Weise zu verändern.

HES ist das hydroxyethylierte Derivat des in Wachsmaisstärke zu über 95 % vorkommenden Glucosepolymers Amylopektin. Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, die in  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen vorliegen und  $\alpha$ -1,6-glykosidische Verzweigungen aufweisen. HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zur Zeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8 (1987) Seite 271 – 278 und Weidler et. al., Arzneimittelforschung / Drug Res., 41 (1991) Seite 494 – 498).

In DE 196 28 705 und DE 101 29 369 werden konkret für Hämoglobin bzw. Amphotericin B Verfahren beschrieben, wie die Kopplung mit Hydroxyethylstärke in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) über das entsprechende Aldonsäurelacton der Hydroxyethylstärke mit freien Aminogruppen von Hämoglobin bzw. Amphotericin B durchgeführt werden kann.

Da in wasserfreien, aprotischen Lösungsmitteln gerade im Falle der Proteine oft nicht gearbeitet werden kann, entweder aus Löslichkeitsgründen aber auch aus Gründen der Denaturierung der Proteine, sind in der Literatur auch Kopplungsverfahren mit HES im wasserhaltigen Milieu beschrieben. So offenbart zum Beispiel die internationale Patentanmeldung PCT/EP 02/02928 die Kopplung der am reduzierenden Kettenende selektiv zur Aldonsäure oxidieren Hydroxyethylstärke durch Vermittlung von wasserlöslichem

Carbodiimid EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid). Sehr oft jedoch ist der Einsatz von Carbodiimiden mit Nachteilen behaftet, da Carbodiimide sehr häufig inter- oder intramolekulare Vernetzungsreaktionen der Proteine als Nebenreaktionen verursachen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugates aus einem Polynukleotid und einem Polysaccharid bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem ersten Aspekt gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugates aus einem Polynukleotid und einem Polysaccharid umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen einer Aldonsäure des Polysaccharides oder eines Derivates davon;
- b) Umsetzen der Aldonsäure mit einem Alkohol-Derivat, bevorzugterweise einem Carbonat-Derivat eines Alkohols, zu einem Aldonsäure-Ester, bevorzugterweise zu einem aktivierte Aldonsäure-Ester; und
- c) Umsetzen des Aldonsäure-Esters mit dem Polynukleotid, wobei das Polynukleotid eine funktionale Amino-Gruppe aufweist,

dadurch gekennzeichnet, dass das Umsetzen der Aldonsäure mit dem Alkohol-Derivat in Schritt b) in einem trockenen aprotischen polaren Lösungsmittel erfolgt.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Lösungsmittel ausgewählt ist aus der Gruppe, die Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und Dimethylacetamid umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Aldonsäure-Ester gereinigt wird und danach in Schritt c) verwendet wird.

In einer alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Reaktionsansatz aus Schritt b) mit dem Aldonsäure-Ester direkt in Schritt c) eingesetzt wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass Schritt c) bei einem pH-Wertbereich von 7 bis 9, bevorzugterweise 7,5 bis 9 und bevorzugterweise 8,0 bis 8,8 durchgeführt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass Schritt c) bei einem pH-Wert von etwa 8,4 durchgeführt wird.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das molare Verhältnis von Aldonsäure zu Alkohol-Derivat etwa 0,9 bis 1,1, bevorzugterweise etwa 1 beträgt.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Alkohol ausgewählt ist aus der Gruppe, die N-Hydroxy-Succinimid, sulfonierte N-Hydroxy-Succinimid, Phenolderivate und N-Hydroxy-Benzotriazol umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Polysaccharid ausgewählt ist aus der Gruppe, die Dextran, Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke und verzweigte Stärkefraktionen umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Polysaccharid Hydroxyethylstärke ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Hydroxyethylstärke ein gewichtsgemitteltes mittleres Molekulargewicht von etwa 3.000 bis 100.000 Dalton, bevorzugterweise von etwa 5.000 bis 60.000 aufweist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Hydroxyethylstärke ein Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichtes von etwa 2.000 bis 50.000 Dalton aufweist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Hydroxyethylstärke ein Verhältnis von gewichtsgemitteltem Molekulargewicht zu Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichts von etwa 1,05 bis 1,20 aufweist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Hydroxyethylstärke eine molare Substitution von 0,1 bis 0,8, bevorzugterweise von 0,4 bis 0,7 aufweist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Hydroxyethylstärke ein Substitutionsmuster ausgedrückt als das C2/C6-Verhältnis von etwa 2 bis 12, bevorzugterweise von etwa 3 bis 10 aufweist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Polynukleotid eine funktionelle Nukleinsäure ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die funktionale Nukleinsäure ein Aptamer oder ein Spiegelmer ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Polynukleotid ein Molekulargewicht von 300 bis 50,000 Da, bevorzugterweise 4,000 bis 25,000 Da und bevorzugterweise 7,000 bis 16,000 Da aufweist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die funktionale Aminogruppe eine primäre oder sekundäre Aminogruppe ist, bevorzugterweise eine primäre Aminogruppe ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die funktionale Aminogruppe an ein terminales Phosphat des Polynukleotids gebunden ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die funktionale Aminogruppe über einen Linker an die Phosphatgruppe gebunden ist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass die funktionale Aminogruppe eine 5-Aminohexylgruppe ist.

In einem zweiten Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Konjugat aus einem Polysaccharid und einem Polynukleotid, erhältlich nach einem Verfahren gemäß dem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung.

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass aus Hydroxyethylstärke-Aldonsäuren sowie Aldonsäuren von anderen Polysacchariden, wie z. B.

Wachsmaisstärke-Abbaufraktionen, in trockenen aprotischen, polaren Lösungsmitteln, wie beispielsweise Dimethylacetamid (DMA), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylformamid (DMF), mit Alkoholen, insbesondere mit den Carbonaten von Alkoholen, also den Diestern der Kohlensäure mit Alkoholen, wie z. B. N-Hydroxy-Succinimide, die entsprechenden Aldonsäureester hergestellt werden konnten, die sich im wässrigen Milieu mit nukleophilen Aminogruppen von Polynukleotiden zu stabileren Amiden vorteilhafterweise umsetzen lassen. Als Nebenreaktion tritt eine Verseifung der Aldonsäureester mit Wasser zur freien Aldonsäure und zum freien Alkohol auf.

Überraschenderweise tritt dabei keine Aktivierung der Hydroxylgruppen der Anhydroglucosidseenheiten auf, sondern spezifisch die Aktivierung der Carboxylgruppe der Aldonsäuren, sofern man die molaren Verhältnisse der Reaktanten in der Nähe von 1:1 einstellt.

Die vorliegende Erfindung wendet sich insoweit von den bisher im Stand der Technik beschriebenen Lehren ab, bzw. beruht auf der Erkenntnis, dass die verschiedenen, im Stand der Technik beschriebenen Verfahren für eine effiziente Herstellung eines Konjugates aus einem Polynukleotid und einem Polysaccharid nicht geeignet sind.

So wurde von den vorliegenden Erfindern auch überraschenderweise gefunden, dass sich L-5'-aminofunktionalisierte Oligonukleotide nicht mit HES-Aldonsäuren umsetzen lassen über eine Carbodiimid (EDC)-vermittelte Bildung einer Amidbindung mit der 5' Aminogruppe, trotz Variationen der möglichen Reaktionsparameter und Reaktantenverhältnisse.

Zwar ist bekannt, dass Phosphate und Phosphatgruppen enthaltende Verbindungen den Verlust von Carbodiimiden anwachsen lassen, oft auch dramatisch, aber selbst große Überschüsse an EDC führten im vorliegenden Fall nicht zu messbarem Reaktionsprodukt (S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC-Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C. (1993) Seite 199).

Weiterhin ist bekannt, dass in wässrigem Milieu EDC eingesetzt werden kann, um Aminofunktionen enthaltende Moleküle an die terminale Phosphatgruppe von Oligonukleotiden unter Bildung einer Phosphoramidatbindung zu koppeln. Unter den dabei

realisierten Reaktionsbedingungen reagieren die internen Phosphatgruppen nicht. Auf diesem Wege können insbesondere 5'Phosphatgruppen spezifisch modifiziert werden (Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto (1996) Seite 52).

Weiterhin wurde überraschenderweise gefunden, dass auch andere etablierte Kopplungsmethoden, die in der Literatur für Hydroxyethylstärke-Derivate beschrieben sind, sich nicht erfolgreich mit 5-aminofunktionalisierten L-Oligonukleotiden anwenden ließen. So ist es eine gängige Methode, zur Herstellung von Säureamiden im Sinne einer Bildung einer Amidbindung als Zwischenstufe aus der Säure das reaktive Säureimidazolid zu bilden, und anschließend mit diesem aktiven Acylierungsmittel die Umsetzung des Amins zum entsprechenden Amid unter Freisetzung von Imidazol durchzuführen.

Im Falle der HES-Aldonsäuren gelang die Herstellung des reaktiven HES-Imidazolids. Dieses zersetzte sich jedoch bei der Umsetzung in wässriger Lösung bei allen untersuchten pH-Werten und Reaktanten-Verhältnissen zu Imidazol und HES-Säure, ohne eine Kopplung mit dem an und für sich nukleophileren 5-aminofunktionalisierten Polynukleotid einzugehen.

Als weitere Möglichkeit wurde die Kopplung über einen aktiven Hydroxysuccinimid-Ester der HES-Säure angestrebt, der zuvor in wasserfreiem Milieu nach Literaturvorschriften entweder via EDC-Aktivierung, oder durch Umsetzung des HES-Lactons mit Hydroxysuccinimid in wasserfreiem Milieu hergestellt wurde. Keine der beiden Methoden war jedoch erfolgreich.

Auch die Umsetzung von HES über die einzige reduzierende Endgruppe mit dem aminofunktionalisierten Polynukleotid im Sinne einer reduktiven Aminierung verlief erfolglos, trotz sehr langer Reaktionszeiten.

Das Reaktionsschema der erfindungsgemäßen Herstellung eines Konjugates aus einem Polynukleotid und einem Polysaccharid ist in Fig. 1 dargestellt, wobei Fig. 1A die Struktur der Aldonsäure-Gruppe der Aldonsäure des Polysaccharides zeigt und Fig. 1B den Reaktionsablauf verdeutlicht. Die Reaktionsgleichungen in Fig. 2, die Gegenstand der

Beispiele 4 bis 14 sind, fassen die nicht erfolgreichen Versuche zur Herstellung eines Konjugates aus einem Polynukleotid und einem Polysaccharid zusammen.

Obgleich das erfindungsgemäße Verfahren grundsätzlich nicht auf bestimmte Polysaccharide beschränkt ist, stellt Hydroxyethylstärke ein besonders bevorzugtes Polysaccharid dar. Es ist jedoch auch im Rahmen der Erfindung, dass andere Stärkederivate, wie z.B. Hydroxyprolylstärke verwendet werden. Ebenfalls können im Rahmen der vorliegenden Erfindung die in der deutschen Patentanmeldung 102 17 994 beschriebenen hyperverzweigten Stärkefraktionen, insbesondere hyperverzweigte Stärkefraktionen mit Verzweigungsgraden größer als 10 mol%, bevorzugterweise größer als 10 mol% und kleiner als 16 mol%, verwendet werden.

HES wird im wesentlichen über das gewichtsgemittelte mittlere Molekulargewicht Mw, das Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichts Mn, die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Die Substitution mit Hydroxyethylgruppen in Ätherbindung ist dabei an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 6 der Anhydroglucoseeinheiten möglich. Das Substitutionsmuster wird dabei als das Verhältnis der C2 zur C6 Substitution beschrieben (C2/C6-Verhältnis). Der Substitutionsgrad kann dabei als DS (engl. für „degree of substitution“), welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemoleküle aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS (engl. für „molar substitution“) beschrieben werden, womit die mittlere Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.

In der wissenschaftlichen Literatur wie auch hierin wird als Kurzbezeichnung für Hydroxyethylstärke das Molekulargewicht Mw in der Einheit kDalton zusammen mit dem Substitutionsgrad MS angegeben. So bezeichnet HES 10/0,4 eine Hydroxyethylstärke des Molekulargewichtes Mw von 10.000 und des Substitutionsgrades MS von 0,4.

Die Herstellung der erfindungsgemäß verwendeten Aldonsäureester erfolgt durch die Umsetzung der Aldonsäure des Polysaccharids bzw. ihrer Derivate in trockenen, aprotischen Lösungsmitteln wie z. B. Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylacetamid (DMA) und den Carbonaten der Alkoholkomponente. Die hierin

beschriebenen Aldonsäuren sind im Stand der Technik bekannt und können beispielsweise gemäß der Offenbarung der Deutschen Patentanmeldung DE 196 28 705 hergestellt werden.

Bei der Reaktion der Aldonsäure mit dem Alkohol-Derivat, insbesondere den Carbonaten des jeweils verwendeten Alkohols, beträgt das molare Verhältnis etwa 0,9 bis 1,1, bevorzugterweise etwa 1,0, da bei einem Überschuss an Carbonat, wie dies durch das Alkohol-Derivat bereitgestellt wird, selektiv OH-Gruppen des Polysaccharids aktiviert werden und bei einem Unterschuss überschüssige Säurefunktionen nicht umgesetzt werden.

Besonders bevorzugte Alkohole im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind N-Hydroxy-Succinimid, sulfonierte N-Hydroxy-Succinimid, Phenolderivate und N-Hydroxy-Benzotriazol. Geeignete Phenolderivate umfassen, unter anderem, chlorierte, fluorierte oder nitrierte Verbindungen, wobei diese insbesondere durch die vorstehend genannten elektrophilen Gruppen einfach oder mehrfach aktiviert sein können. Entsprechend ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, mono- oder polychlorierte Phenole, mono- oder polyfluorierte Phenole oder mono- oder polynitrierte Phenole zu verwenden.

Die erfindungsgemäß verwendeten Aldonsäureester können aus der Lösung in DMF durch trockenes Ethanol, Isopropanol oder Aceton gefällt und durch mehrfaches Wiederholen des Vorganges gereinigt bzw. angereichert werden. Solche Aldonsäureester können dann in Substanz isoliert zur Kopplung an Polysaccharide verwendet werden. Die Lösung der Reaktionsprodukte in inertem apolarem Lösungsmittel kann jedoch auch direkt, ohne Isolierung des aktiven Aldonsäureesters zur Kopplung an Polysaccharide weiterverwendet werden.

Grundsätzlich ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine jegliche Art von Polynukleotiden mit einem Polysaccharid konjugiert wird. Das Polynukleotid kann dabei aus L-Nukleosiden oder D-Nukleosiden oder Mischungen davon hergestellt sein, wobei diese einzeln oder insgesamt weitere Modifizierungen aufweisen können, wie beispielsweise Modifizierungen zur Erhöhung der Stabilität in biologischen Systemen. Eine derartige Modifizierung stellt beispielsweise die Fluorierung an der Position 2' des Zuckerbestandteils der Nukleotide bzw. Nukleoside dar. Dabei ist es auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass zumindest ein Teil der Zuckerbestandteile der das Polynukleotid aufbauenden

Nukleotide einen anderen Zucker als Ribose oder Desoxyribose aufweisen kann. Derartige Zucker können beispielsweise weitere Pentosen, wie zum Beispiel Arabinose, aber auch Hexosen oder Tetrosen sein. Derartige Zucker können auch ein Stickstoffatom oder Schwefelatom enthalten, wie zum Beispiel in einem Aza- oder einem Thiozucker, und/oder der Zuckeranteil des Polynukleotides zumindest teilweise durch einen Morpholino-Ring ersetzt sein. Weiterhin kann das Poynukleotid zumindest teilweise als locked Nukleinsäuren (LNA) oder Peptid-Nukleinsäure (PNA) ausgebildet sein. Die OH-Gruppen der das Rückgrat des Polynukleotids aufbauenden Molekülbestandteile können durch geeignete NH<sub>2</sub>-, SH-, Aldehyd-, Carboxysäure-, Phosphat-, Jod-, Brom-, oder Chlorgruppen chemisch modifiziert vorliegen.

Es ist weiterhin im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass es sich bei dem Polynukleotid um eine Ribonukleinsäure oder eine Desoxyribonukleinsäure oder Kombinationen davon handelt, d. h. einzelne oder eine Gruppe von Nukleotiden als RNA vorliegen und die weiteren, die Nukleinsäure aufbauende Nukleotide als DNA vorliegen und umgekehrt. Der Begriff L-Nukleinsäure wird hierin synonym zu dem Begriff L-Oligonukleotid oder L-Polynukleotid verwendet und bezeichnet, unter anderem, sowohl L-Desoxyribonukleinsäure wie auch L-Ribonukleinsäure und Kombinationen davon, d. h. dass einzelne oder eine Gruppe von Nukleotiden als RNA vorliegen und die weiteren die Nukleinsäure aufbauenden Nukleotide als DNA vorliegen und umgekehrt. Dabei ist auch vorgesehen, dass anstelle von Desoxyribose oder Ribose andere Zucker die Zuckerkomponente des Nukleotids ausbilden. Weiterhin umfasst ist die Verwendung von Nukleotiden mit weiteren Modifikationen an Position 2' wie NH<sub>2</sub>, OMe, OEt, OAlkyl, NHAlkyl und die Verwendung von natürlichen oder unnatürlichen Nukleobasen wie zum Beispiel Isocytidin, Isoguanosin. Es ist dabei auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die L-Nukleinsäure sogenannte abasiche Positionen aufweist, d. h. Nukleotide, denen die Nukleobase fehlt. Derartige abasiche Positionen können sowohl innerhalb der Nukleotidsequenz der L-Nukleinsäure angeordnet sein, wie auch an einem oder beiden der Enden, d. h. dem 5'- und/oder dem 3'- Ende.

Weiterhin ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass das Polynukleotid einzelsträngig vorliegt, wobei es jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist, dass dieses doppelsträngig vorliegt. Typischerweise handelt es sich bei dem erfindungsgemäß verwendeten Polynukleotid um eine einzelsträngige L-Nukleinsäure, die jedoch bedingt durch

ihre Primärsequenz definierte Sekundärstrukturen und auch Tertiärstrukturen ausbilden kann. In der Sekundärstruktur liegen bei einer Vielzahl von L-Nukleinsäuren auch doppelsträngige Abschnitte vor.

Bei den hierin beschriebenen konjugierten Nukleinsäuren handelt es sich bevorzugterweise um sog. Spiegelmer. Wie eingangs bereits erwähnt, sind Spiegelmer funktionale L-Nukleinsäuren oder L-Polynukleotide, d. h. solche Nukleinsäuren, die an ein Zielmolekül oder einen Teil davon binden, und das Ergebnis des Kontaktierens einer Nukleinsäurebibliothek, insbesondere einer statistischen Nukleinsäurebibliothek, mit dem Zielmolekül sind.

Für ein Selektionsverfahren zur Entwicklung funktionaler Nukleinsäuren werden zunächst kombinatorische DNA-Bibliotheken hergestellt. In der Regel handelt es sich um die Synthese von DNA-Oligonukleotiden, die zentral einen Bereich aus 10-100 randomisierten Nukleotiden enthalten, die von zwei primer-Bindungsregionen 5'- und 3'-terminal flankiert werden. Die Herstellung derartiger kombinatorischer Bibliotheken ist bspw. beschrieben in Conrad, R.C., Giver, L., Tian, Y. and Ellington, A.D., 1996, Methods Enzymol., Vol 267, 336-367. Eine solche chemisch synthetisierte einzelsträngige DNA-Bibliothek lässt sich über die Polymerase-Kettenreaktion in eine doppelsträngige Bibliothek überführen, die für sich genommen schon für eine Selektion eingesetzt werden kann. In der Regel erfolgt jedoch mit geeigneten Methoden eine Separation der einzelnen Stränge, so dass man wieder zu einer Einzelstrangbibliothek gelangt, die für das *in vitro* Selektionsverfahren eingesetzt wird, wenn es sich um eine DNA-Selektion handelt (Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. und Toole, J.J., 1992, Nature, Vol. 355, 564-566). Es ist jedoch ebenso möglich, die chemisch synthetisierte DNA-Bibliothek direkt in die *in vitro* Selektion einzusetzen. Darüber hinaus kann prinzipiell aus doppelsträngiger DNA, wenn zuvor ein T7 Promotor eingeführt worden ist, auch über eine geeignete DNA-abhängige Polymerase, z. B. die T7 RNA Polymerase, eine RNA-Bibliothek erzeugt werden. Mit Hilfe der beschriebenen Verfahren ist es möglich, Bibliotheken von  $10^{15}$  und mehr DNA- oder RNA-Molekülen zu erzeugen. Jedes Molekül aus dieser Bibliothek hat eine andere Sequenz und somit eine andere dreidimensionale Struktur.

Über das in vitro Selektionsverfahren ist es nun möglich, aus der erwähnten Bibliothek durch mehrere Zyklen von Selektion und Amplifikation sowie gegebenenfalls Mutation ein oder mehrere DNA-Moleküle zu isolieren, die gegen ein gegebenes Target eine signifikante Bindungseigenschaft aufweisen. Die Targets können z. B. Viren, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, kleine Moleküle wie Metaboliten des Stoffwechsels, pharmazeutische Wirkstoffe oder deren Metaboliten oder andere chemische, biochemische oder biologische Komponenten sein wie beispielsweise in Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. und Yarus, 1995, Annu. Rev. Biochem. Vol. 64, 763-797 und Lorsch, J.R. und Szostak, J.W., 1996, Combinatorial Libraries, Synthesis, Screening and application potential, ed. Riccardo Cortese, Walter de Gruyter, Berlin, beschrieben. Das Verfahren wird in der Weise durchgeführt, dass bindende DNA- oder RNA-Moleküle aus der ursprünglich eingesetzten Bibliothek isoliert und nach dem Selektionsschritt mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden. Bei RNA-Selektionen ist dem Amplifikationsschritt durch Polymerase-Kettenreaktion eine reverse Transkription vorzuschalten. Eine nach einer ersten Selektionsrunde angereicherte Bibliothek kann dann in eine erneute Selektionsrunde eingesetzt werden, so dass die in der ersten Selektionsrunde angereicherten Moleküle die Chance haben, durch Selektion und Amplifikation sich erneut durchzusetzen und mit noch mehr Tochtermolekülen in eine weitere Selektionsrunde zu gehen. Gleichzeitig eröffnet der Schritt der Polymerase-Kettenreaktion die Möglichkeit, neue Mutationen bei der Amplifikation einzubringen, z.B. durch die Variation der Salzkonzentration. Nach genügend vielen Selektions- und Amplifikationsrunden haben sich die bindenden Moleküle durchgesetzt. Es ist so ein angereicherter Pool entstanden, dessen Vertreter durch Klonierung vereinzelt und anschließend mit den gängigen Methoden der Sequenzbestimmung von DNA in ihrer Primärstruktur bestimmt werden können. Die erhaltenen Sequenzen werden dann auf ihre Bindungseigenschaften hinsichtlich des Targets überprüft. Das Verfahren zur Erzeugung derartiger Aptamere wird auch als SELEX-Verfahren bezeichnet und ist bspw. beschrieben in EP 0 533 838, dessen Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

Die besten Bindungsmoleküle können durch Verkürzung der Primärsequenzen auf ihre wesentliche Bindungsdomäne verkürzt und durch chemische oder enzymatische Synthese dargestellt werden.

Eine besondere Form von solchermaßen herstellbaren Aptameren sind die sogenannten Spiegelmere, die sich im wesentlichen dadurch auszeichnen, dass sie zumindest teilweise, bevorzugt vollständig aus den nicht-natürlichen L-Nukleotiden aufgebaut sind. Verfahren zur Herstellung derartiger Spiegelmere sind beschrieben in PCT/EP97/04726, deren Offenbarung hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird. Die Besonderheit des darin beschriebenen Verfahrens liegt in der Erzeugung von enantiomeren Nukleinsäuremolekülen, d.h. von L-Nukleinsäuremolekülen, die an ein natives, d.h. in der natürlichen Form oder Konfiguration vorliegendes Target oder eine derartige Targetstruktur binden. Das oben beschriebene *in vitro* Selektionsverfahren wird dazu eingesetzt, bindende Nukleinsäuren oder Sequenzen zunächst gegen die Enantiomere, d.h. nicht natürlich vorkommenden Struktur eines natürlicherweise vorkommenden Targets zu selektieren, beispielsweise im Falle, dass das Zielmolekül ein Protein ist, gegen ein D-Protein. Die so erhaltenen Bindungsmoleküle (D-DNA, D-RNA bzw. entsprechende D-Derivate) werden in ihrer Sequenz bestimmt und die identische Sequenz wird dann mit spiegelbildlichen Nukleotidbausteinen (L-Nukleotide bzw. L-Nukleotidderivate) synthetisiert. Die so erhaltenen spiegelbildlichen, enantiomeren Nukleinsäuren (L-DNA, L-RNA bzw. entsprechende L-Derivate), sogenannte Spiegelmere, haben aus Symmetriegründen eine spiegelbildliche Tertiärstruktur und somit eine Bindungseigenschaft für das in der natürlichen Form oder Konfiguration vorliegende Target.

Die Polynukleotide, insbesondere die funktionalen Nukleinsäuren wie Aptamere oder Spiegelmere, wie sie in den hierin beschriebenen Selektions- und Verkürzungsverfahren erhalten werden, besitzen ein Molekulargewicht etwa von 300 Da bis 50,000 Da. Bevorzugterweise weisen diese ein Molekulargewicht von 4,000 Da bis 25,000 Da, bevorzugterweise von 7,000 bis 16,000 Da auf.

Die vorstehend beschriebenen Zielmoleküle, auch als Target bezeichnet, können Moleküle oder Strukturen sein, so z. B. Viren, Viroide, Bakterien, Zelloberflächen, Zellorganellen, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, kleine Moleküle wie Metaboliten des Stoffwechsels, pharmazeutische Wirkstoffe oder deren Metabolite oder andere chemische, biochemische oder biologische Komponenten.

Gemäß dem erfundungsgemäßen Verfahren weist das Polynukleotid, bevorzugterweise an einer Phosphatgruppe des Polynukleotids, eine nukleophile Gruppe auf, mit der der

Aldonsäure-Ester zur Ausbildung des Konjugates reagiert. Dabei ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt, dass diese nukleophile Gruppe eine funktionale Aminogruppe, bervor zugterweise eine primäre Aminogruppe ( $\text{NH}_2$ -Gruppe) ist. Es ist auch im Rahmen der Erfindung, dass das mit dem Aldonsäure-Ester umgesetzte Polynukleotid eine funktionelle sekundäre Aminogruppe, eine Iminogruppe, enthält.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung jedoch besonders bevorzugt, dass es sich bei der nukleophilen Gruppe um eine primäre Amino-Gruppe handelt, die bevorzugterweise an eine Phosphatgruppe des Polynukleotids gebunden vorliegt. Bevorzugterweise liegt die Amino-Gruppe an der Phosphat-Gruppe am 5'- oder am 3'-Ende, also den terminalen Phosphatgruppen, des Polynukleotids vor. Die Aminogruppe kann dabei in einer Ausführungsform entweder direkt an die Phosphatgruppe oder über einen Linker an die Phosphatgruppe gebunden sein. Derartige Linker sind in der Technik bekannt. Bevorzugte Linker sind Alkylreste mit einer Länge von 1 bis 8, bevorzugterweise 2 bis 6 C-Atomen. Insbesondere bei Verwendung von Aldonsäure-Estern des N-Hydroxy-Succinimids werden die in dem Polynukleotid weiterhin vorhandenen nukleophilen Gruppen wie die Purin- oder Pyrimidin-Base in den Nukleinsäuren nicht umgesetzt.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele veranschaulicht, aus denen sich weitere Merkmale, Ausführungsformen und Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben. Dabei zeigt:

Fig. 1A die chemische Struktur der Aldonsäure-Gruppe der HES-Aldonsäure;

Fig. 1B ein Reaktionsschema zur erfindungsgemäßen Aktivierung von HES-Aldonsäure mit einem Carbonat-Derivat eines Alkohols zu einem Aldonsäure-Ester und dessen Umsetzung mit einem eine funktionale Aminogruppe tragenden Polynukleotid;

Fig. 2A das Reaktionsschema der Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure gemäß dem Stand der Technik, insbesondere gemäß der Beispiele 4-9;

- Fig. 2B das Reaktionsschema der Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure gemäß dem Stand der Technik, insbesondere gemäß dem Beispiel 10;
- Fig. 2C das Reaktionsschema der Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure gemäß dem Stand der Technik, insbesondere gemäß dem Beispiel 11;
- Fig. 2D das Reaktionsschema der Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure gemäß dem Stand der Technik, insbesondere gemäß der Beispiele 12-13;
- Fig. 2E das Reaktionsschema der Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES gemäß dem Stand der Technik, insbesondere gemäß dem Beispiel 14;
- Fig. 3 ein Chromatogramm des Ergebnisses eines Reaktionsansatzes zur HESylierung eines Spiegelmeres gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere gemäß Beispiel 1;
- Fig. 4 ein Chromatogramm des Ergebnisses eines weiteren Reaktionsansatzes zur HESylierung eines Spiegelmeres gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere gemäß Beispiel 1; und
- Fig. 5 ein Diagramm der durch HESyliertes Spiegelmer bzw. nicht-HESyliertes Spiegelmer bedingten Hemmung von Ghrelin-induzierter Calcium<sup>2+</sup>-Freisetzung.

**Beispiel 1:** Herstellen eines Konjugates aus einem Spiegelmer und Hydroxyethylstärke

Eingesetztes HESylat

Es wurde HES 10/0.4 mit den molekularen Parametern Mw 11092 D, MS 0,4 und C2/C6 >8, welches am reduzierenden Kettenende zur Carbonsäure oxidiert war, verwendet. Eine Beschreibung der Herstellung der HES-Säure ist beispielsweise in der Deutschen Patentanmeldung DE 196 28 705 offenbart.

Herstellen des NHS-Esters

Der N-Hydroxy-Succinimid-Ester des HESylats wurde wie folgt hergestellt:

0,2 g (0,05 mMol) wasserfreie HES-Säure 10/0.4 werden in 1 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit einer äquimolaren Menge an N,N'-Disuccinimidylcarbonat (12,8 mg) 1,5 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt.

Herstellung des Spiegelmer-HESylates

5 mg (entsprechend 1,3 µmol) 5'-Aminohexyl funktionalisiertes RNA-Spiegelmer gemäß Seq. ID. Nr.1 werden in 0,7 ml einer 0,3 molaren Dicarbonatlösung mit einem pH von 8,4 gelöst. Zu dieser Lösung wird der aktive Ester, hergestellt wie vorstehend beschrieben, direkt hinzugegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden umgesetzt.

Das RNA-Spiegelmer weist die folgende Sequenz auf:

5'-Aminohexyl-UGAGUGACUGAC-3' (SEQ. ID. NO. 1)

Analyse des solchermaßen hergestellten Konjugates

Der Nachweis des Konjugates erfolgt durch Niederdruck-GPC. Die dabei verwendeten Analysebedingungen waren die folgenden, wobei das Analysenergebnis in Fig. 3 dargestellt ist:

Säule: Superose 12 HR 10/30, 300 mm x 10 mm i.D.  
(Pharmacia, Art.-Nr. 17-0538-01)

Laufmittel: Phosphatpuffer pH 7,0  
(27,38 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12,62 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
0,2 M NaCl, 0,005% NaN<sub>3</sub> in Milli-Q Wasser)

Flussrate: 0,4 ml/min

Detektion: UV 280 nm

Laufzeit: 70 min

Injektionsvolumen: 20 µl Originalansatz

Bei dem Reaktionsansatz ergab sich eine Ausbeute von 62% (bei Lotfällung bezüglich des Chromatogramms) bzw. 77% bei tailingpeak-Auswertung.

Die vorstehende Reaktion wurde mit einer weiteren Form von Hydroxyethylstärke (50/0.7) durchgeführt, welche die folgenden molekularen Parameter aufwies: Mw: 54110 D, MS: 0,7 und C2/C6: ~5.

Bei ansonsten identischer Reaktionsführung wurde eine Ausbeute von 53% erhalten. Das entsprechende GPC-Chromatogramm des Reaktionsproduktes ist in Fig. 4 dargestellt.

**Beispiel 2:** Erhöhung der Ausbeute des Konjugates

Unter Zugrundelegung der in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrensweise wurde das Verhältnis von portionsweise zugegebenem aktivierten Aldonsäure-Ester zu Test-RNA-Spiegelmer auf 2:1 bzw. 3:1 erhöht. Dabei wurde im Falle der Verdoppelung des Verhältnisses eine Ausbeute von mehr als 95% und bei Verdreifachung des Überschusses des aktivierten Aldonsäure-Esters eine nahezu quantitative Ausbeute (> 98 bis 99%) erhalten.

**Beispiel 3:** Vergleich der Hemmung der Ghrelin-induzierten Calciumfreisetzung durch Ghrelin-bindende HESylierte und nicht-HESylierte Spiegelmere.

Stabil transfizierte CHO-Zellen, die den humanen Rezeptor für Ghrelin (GHS-R1a) exprimieren (bezogen von Euroscreen, Gosselies, Belgien) werden in einer Zahl von 5 - 7 x 10<sup>4</sup> pro well einer schwarzen 96 well-Mikrotiterplatte mit klarem Boden (Greiner) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in UltraCHO Medium (Cambrex), das zusätzlich 100 units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 400 µg/ml Geneticin und 2,5 µg/ml Fungizone enthält, kultiviert.

Nicht-HESylierte sowie gemäß Beispiel 1 hergestellte 5'-HESylierte Formen des Ghrelin-bindenden Spiegelmers mit der internen Bezeichnung SOT-B11 gemäß SEQ. ID Nr. 2 werden zusammen mit humanem oder Ratten-Ghrelin (Bachem) in UltraCHO Medium, dem 5 mM Probenecid und 20 mM HEPES zugesetzt wurde (CHO-U+), 15 – 60 min bei RT oder 37°C in einer 0,2 ml "low profile 96-tube"-Platte inkubiert. Diese Stimulationslösungen werden als zehnfach konzentrierte Lösungen in CHO-U+ angesetzt.

Sequenz von SOT-B11: 5' - CGU GUG AGG CAA UAA AAC UUA AGU CCG AAG GUA ACC AAU CCU ACA CG -3' (Seq. ID. Nr.2)

Vor der Beladung mit dem Calcium-Indikatorfarbstoff Fluo-4 werden die Zellen 1 x mit je 200 µl CHO-U+ gewaschen. Dann werden 50 µl der Indikatorfarbstofflösung (10 µM Fluo-4 (Molecular Probes), 0.08% Pluronic 127 (Molecular Probes) in CHO-U+ zugegeben und 60

min bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen 3 x mit je 180 µl CHO-U+ gewaschen. Pro well werden dann 90 µl CHO-U+ zugegeben.

Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm in einem Fluostar Optima Multidektions-Plattenlesegerät (BMG).

Zur genauen Analyse des Zeitverlaufs der durch Ghrelin hervorgerufenen Änderungen der Calcium-Konzentrationen werden die Stimulationslösungen zu den Zellen hinzugefügt. Für die parallele Messung mehrerer Proben werden jeweils die wells einer senkrechten Reihe einer 96 well Platte gemeinsam vermessen. Dazu werden zunächst im Abstand von 4 Sekunden drei Messwerte zur Feststellung der Basislinie registriert. Dann wird die Messung unterbrochen, die Platte aus dem Lesegerät ausgefahren und mit einer Mehrkanalpipette 10 µl der Stimulationslösung aus der "low profile 96-tube"-Platte, in der die Vorinkubation durchgeführt wurde, zu den wells der zu messenden Reihe zugegeben. Dann wird die Platte wieder in das Gerät eingefahren und die Messung fortgesetzt (insgesamt 20 Messungen mit je 4 Sekunden Abstand).

Aus den erhaltenen Messkurven wird für jedes einzelne well die Differenz zwischen maximalem Fluoreszenzsignal und Fluoreszenzsignal vor der Stimulation bestimmt und gegen die Konzentration an Ghrelin bzw., bei Versuchen zur Hemmung der Calcium-Freisetzung mit Spiegelmeren, gegen die Konzentration an Spiegelmer aufgetragen.

Um die Wirksamkeit der HESylierten Spiegelmere zu zeigen, wurden Ghrelinrezeptor-exprimierende Zellen mit 5 nM Ghrelin, oder Ghrelin, das zusammen mit verschiedenen Mengen HESyliertem bzw. nicht-HESyliertem Spiegelmer vorinkubiert worden war, stimuliert. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden auf die Signale, die ohne Spiegelmer erhalten wurden, normiert. Das HESylierte Spiegelmer hemmt die Ghrelin-induzierte Ca<sup>++</sup>-Freisetzung mit einer IC<sub>50</sub> von ca. 6,5 nM wohingegen das nicht-HESylierte Spiegelmer mit einer IC<sub>50</sub> von ca. 5 nM hemmt. Das Ergebnis ist in Fig. 5 dargestellt.

**Beispiel 4:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

0,25 g HES 10/0,4 – Aldonsäure (62,5 µmol) werden unter Rühren in 10 mL Wasser gelöst. Zu der Lösung werden 9,95 mg (2,5 µmol) RNA-Spiegelmer gemäß SEQ. ID. Nr. 1 bei Raumtemperatur gegeben. Anschließend werden unter Rühren 50 mg N-Ethyl-N’-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (261 µmol), gelöst in 1 mL Wasser, portionsweise über 2 Stunden bei Raumtemperatur zugegeben. Durch Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge wird ein pH-Wert von 5 konstant gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz noch 2 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Überprüfung des Reaktionsansatzes über Niederdruck-GPC ergab einen Reaktionsumsatz des eingesetzten Spiegelmers von weniger als 1%.

**Beispiel 5:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

Zu einer Mischung von HES 10/0,4 – Aldonsäure und RNA-Spiegelmer gemäß Seq. ID. Nr. 1, werden 150 mg EDC analog dem Beispiel 4 über 3 Stunden bei Raumtemperatur und unter Rühren zugegeben. Es konnte über analytische Niederdruck-GPC kein Reaktionsumsatz festgestellt werden.

**Beispiel 6:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

1,0 g HES 10/0,4 – Aldonsäure (240 µmol) werden unter Rühren in 10 mL Wasser in der Wärme gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden dem Ansatz 10 mg des RNA-Spiegelmers gemäß Seq. ID. Nr. 1 zugegeben. Anschließend werden unter Rühren 50 mg EDC (260 µmol), gelöst in 1 mL Wasser, über 2 Stunden bei Raumtemperatur portionsweise zugegeben, wobei mit Salzsäure oder Natronlauge der pH-Wert bei 5 konstant gehalten wird.

Nach weiteren 2 Stunden Reaktionszeit wird der Ansatz mittels Niederdruck-GPC analysiert.  
Es konnte kein Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

**Beispiel 7:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

Der Ansatz nach Beispiel 6 wurde wiederholt, wobei in diesem Falle 100 mg EDC über 3 Stunden zugegeben wurden.

Nach Beendigung der Reaktion konnte kein Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

**Beispiel 8:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

Die Beispiele 6 und 7 wurden wiederholt bei pH-Werten von 4,0 und 6,0.

Es konnte in beiden Reaktionsansätzen mittels Niederdruck-GPC kein Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

**Beispiel 9:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

Das Beispiel 4 wurde bei Reaktionstemperaturen von 4°C und 37°C wiederholt.

In beiden Fällen wurde kein Reaktionsprodukt nachgewiesen.

**Beispiel 10:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

In 10 mL trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) werden 303,7 mg (2,6 mmol) Succinimid und 0,502 g HES 10/0,4 – Aldonsäure (0,125 mmol) bei Raumtemperatur gelöst.

Danach werden 50 mg EDC (0,25 mmol) zugegeben und der Ansatz über Nacht gerührt.

Jeweils 5 mg (entsprechend 1,3 µmol) RNA-Spiegelmer gemäß Seq. ID. Nr. 1 werden in 10 mL Wasser gelöst und der pH-Wert auf 8,5 mit Natronlauge eingestellt bzw. in 10 mL 0,3 molarem Bicarbonat-Puffer von pH 8,4 gelöst.

Zu den beiden Teilansätzen werden jeweils 5 mL der oben genannten Dimethylsulfoxid-Lösung zugegeben, wobei der pH-Wert der wässrigen Lösung des ersten Teilansatzes durch die Zugabe von Natronlauge bei pH 8,5 konstant gehalten wird.

Die Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die analytische Niederdruck-GPC ergab in beiden Teilansätzen kein Reaktionsprodukt.

**Beispiel 11:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

In 10 mL trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) werden 300 mg (2,6 mmol) Succinimid gelöst und 0,5 g (0,125 mmol) bei 80°C über Nacht zur Bildung des entsprechenden Lactons getrocknete HES 10/0,4 – Aldonsäure zugefügt. Der Ansatz reagiert über Nacht bei 70°C.

Die Lösung wird anschließend bei Raumtemperatur zu 5 mL einer Lösung von 5 mg RNA-Spiegelmer gemäß Seq. ID. Nr. 1 in 10 mL 0,3 molaren Bicarbonatpuffer des pH 8,4 gegeben und bei Raumtemperatur 4 Stunden lang gerührt. Es wurde mittels analytischer Niederdruck-GPC kein Reaktionsprodukt gefunden.

**Beispiel 12:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

5,0 g HES 10/0,4 – Aldonsäure (1,2 mmol) werden in 30 mL trockenem Dimethylformamid (DMF) gelöst. Zu der Lösung werden 195 mg (1,2 mmol) Carbonyldiimidazol (CDI) gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

5 mg RNA-Spiegelmer gemäß Seq. ID. Nr. 1 werden in 5 mL Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 10 mL der oben genannten Lösung der Imidazolyl-HES-Aldonsäure 10/0,4 gegeben und der pH-Wert auf 7,5 mit Natronlauge eingestellt. Nach Rühren bei Raumtemperatur über Nacht wurde der Ansatz mittels Niederdruck-GPC auf Reaktionsprodukt untersucht. Es wurden nur Spuren von Reaktionsprodukt festgestellt.

**Beispiel 13:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES-Aldonsäure unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

5 mg RNA-Spiegelmer gemäß Seq. ID. Nr. 1 werden in 12,5 mL 0,3 M Bicarbonatpuffer des pH 8,4 gelöst. Der Ansatz wurde mit Eiswasser auf 0°C gekühlt und mit 8,5 mL der in Beispiel 12 aufgeführten Lösung von HES 10/0,4 – Aldonsäure-Imidazolyl in DMF versetzt. Nach 2 Stunden bei 0°C und weiteren 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf Reaktionsprodukt untersucht. Es konnte kein Produkt detektiert werden.

**Beispiel 14:** Herstellung von Konjugaten aus einem Polynukleotid und HES unter Anwendung von Verfahren nach dem Stand der Technik

1 g HES 10/0,4 (0,25 mmol) werden in 5 mL H<sub>2</sub>O in der Wärme gelöst. Zu der Lösung werden nach Abkühlen 10 mg (entsprechend 2,5 µmol) RNA-Spiegelmer gemäß Seq. ID. Nr. 1 zugegeben und der pH-Wert mit Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Danach werden 200 µl Boran-Pyridin-Komplex (Sigma-Aldrich) zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur im Dunkeln 10 Tage gerührt. Danach wird der Ansatz auf eventuelle Reaktionsprodukte durch

# **BOHMANN & LOOSEN**

24

Niederdruck-GPC untersucht. Es konnte nur ein Umsatz < 3% bezogen auf das eingesetzte Spiegelmer festgestellt werden.

Die in der vorangehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination zur Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

# BOHMANN & LOOSEN

## Anwaltssozietät

BOHMANN & LOOSEN, Sonnenstr. 8, 80331 München

Deutsches Patent- und Markenamt

80297 München

Patentanwalt – European Patent Attorney  
Dr. Armin K. Bohmann, Dipl.-Biol.\*<sup>1</sup>

Rechtsanwalt  
Peter Loosen, LL.M.<sup>2</sup>

\* Zugelassener Vertreter vor dem Europäischen Markenamt, Alicante  
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

Zustelladresse:  
Sonnenstr. 8  
D-80331 München

Unser Zeichen  
Our ref

N 10040

Ihr Zeichen  
Your ref

Neuanmeldung  
(Patent)

Datum  
Date

München, 09. Februar 2004

**SUPRAMOL Parenteral Colloid GmbH, Industriestr. 1-3, 61191 Rosbach-Rodheim  
NOXXON Pharma AG, Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589 Berlin**

Verfahren zur Herstellung von Konjugaten aus Polysacchariden und Polynukleotiden

### Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates aus einem Polynukleotid und einem Polysaccharid umfassend die Schritte:
  - a) Bereitstellen einer Aldonsäure des Polysaccharides oder eines Derivates davon;
  - b) Umsetzen der Aldonsäure mit einem Alkohol-Derivat, bevorzugterweise einem Carbonat-Derivat eines Alkohols, zu einem Aldonsäure-Ester, bevorzugterweise zu einem aktivierte Aldonsäure-Ester; und
  - c) Umsetzen des Aldonsäure-Esters mit dem Polynukleotid, wobei das Polynukleotid eine funktionale Amino-Gruppe aufweist,

1.5

<sup>1</sup>Sonnenstr. 8 • D-80331 München • Tel.: 089/ 51 55 64 0 • FAX: 089/ 51 55 64 13 • e-mail: BOHMANN-LAW@t-online.de

<sup>2</sup>Schaafenstr. 43 • D-50676 Köln •

- dadurch gekennzeichnet, dass das Umsetzen der Aldonsäure mit dem Alkohol-Derivat in Schritt b) in einem trockenen aprotischen polaren Lösungsmittel erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel ausgewählt ist aus der Gruppe, die Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und Dimethylacetamid umfasst.
  3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Aldonsäure-Ester gereinigt wird und danach in Schritt c) verwendet wird.
  4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Reaktionsansatz aus Schritt b) mit dem Aldonsäure-Ester direkt in Schritt c) eingesetzt wird.
  5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt c) bei einem pH-Wertbereich von 7 bis 9, bevorzugterweise 7,5 bis 9 und bevorzugterweise 8,0 bis 8,8 durchgeführt wird.
  6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt c) bei einem pH-Wert von etwa 8,4 durchgeführt wird.
  7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das molare Verhältnis von Aldonsäure zu Alkohol-Derivat etwa 0,9 bis 1,1, bevorzugterweise etwa 1 beträgt.
  8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Alkohol ausgewählt ist aus der Gruppe, die N-Hydroxy-Succinimid, sulfonierte N-Hydroxy-Succinimid, Phenolderivate und N-Hydroxy-Benzotriazol umfasst.
  9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Polysaccharid ausgewählt ist aus der Gruppe, die Dextran, Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke und verzweigte Stärkefraktionen umfasst.

# BOHMANN & LOOSE

3

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Polysaccharid Hydroxyethylstärke ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyethylstärke ein gewichtsgemitteltes mittleres Molekulargewicht von etwa 3.000 bis 100.000 Dalton, bevorzugterweise von etwa 5.000 bis 60.000 aufweist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyethylstärke ein Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichtes von etwa 2.000 bis 50.000 Dalton aufweist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyethylstärke ein Verhältnis von gewichtsgemitteltem Molekulargewicht zu Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichts von etwa 1,05 bis 1,20 aufweist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyethylstärke eine molare Substitution von 0,1 bis 0,8, bevorzugterweise von 0,4 bis 0,7 aufweist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydroxyethylstärke ein Substitutionsmuster ausgedrückt als das C2/C6-Verhältnis von etwa 2 bis 12, bevorzugterweise von etwa 3 bis 10 aufweist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid eine funktionelle Nukleinsäure ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionale Nuklein-säure ein Aptamer oder ein Spiegelmer ist.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Po-lynukleotid ein Molekulargewicht von 300 bis 50,000 Da, bevorzugterweise 4,000 bis 25,000 Da und bevorzugterweise 7,000 bis 16,000 Da aufweist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionale Aminogruppe eine primäre oder sekundäre Aminogruppe ist, bevorzugterweise eine primäre Aminogruppe ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionale Aminogruppe an ein terminales Phosphat des Polynukleotids gebunden ist.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionale Aminogruppe über einen Linker an die Phosphatgruppe gebunden ist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionale Aminogruppe eine 5-Aminohexylgruppe ist.
23. Konjugat aus einem Polysaccharid und einem Polynukleotid, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22.

Zusammenfassung

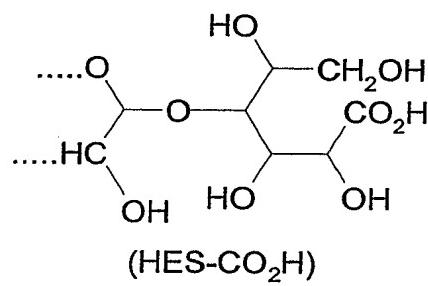
---

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugates aus einem Polynukleotid und einem Polysaccharid umfassend die Schritte:

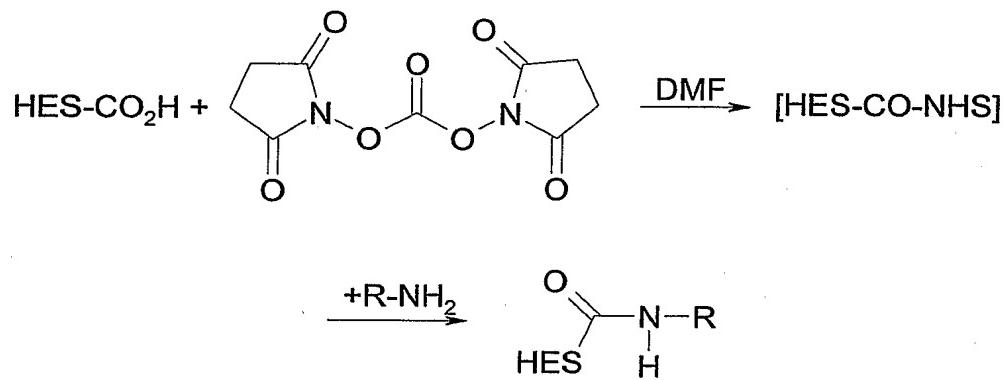
- a) Bereitstellen einer Aldonsäure des Polysaccharides oder eines Derivates davon;
- b) Umsetzen der Aldonsäure mit einem Alkohol-Derivat, bevorzugterweise einem Carbonat-Derivat eines Alkohols, zu einem Aldonsäure-Ester, bevorzugterweise zu einem aktivierten Aldonsäure-Ester; und
- c) Umsetzen des Aldonsäure-Esters mit dem Polynukleotid, wobei das Polynukleotid eine funktionale Amino-Gruppe aufweist,

wobei das Umsetzen der Aldonsäure mit dem Alkohol-Derivat in Schritt b) in einem trockenen aprotischen polaren Lösungsmittel erfolgt.

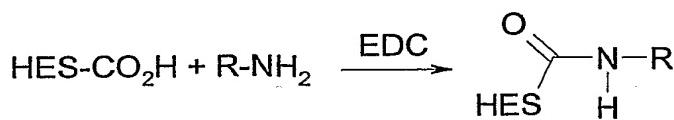
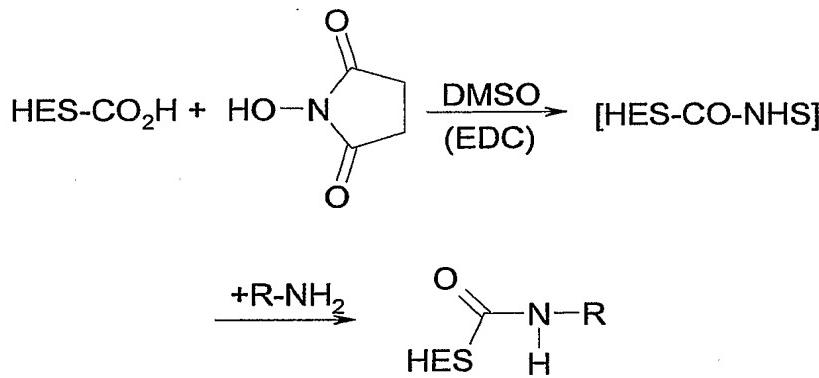
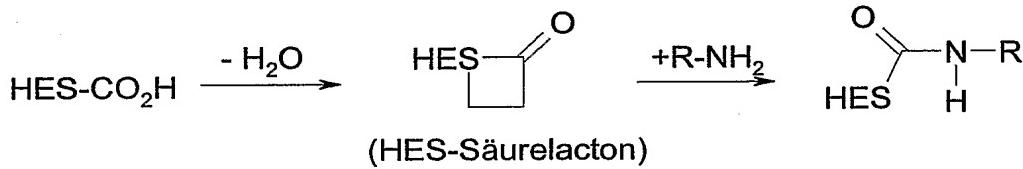
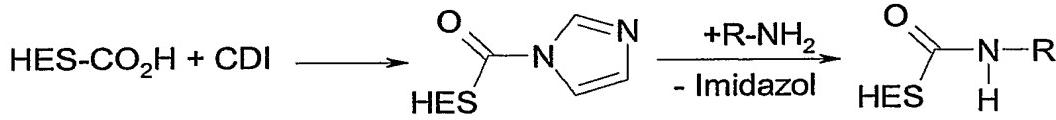
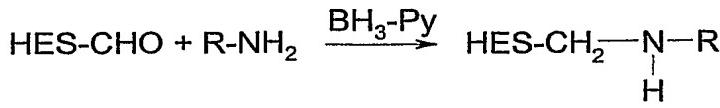
**A**

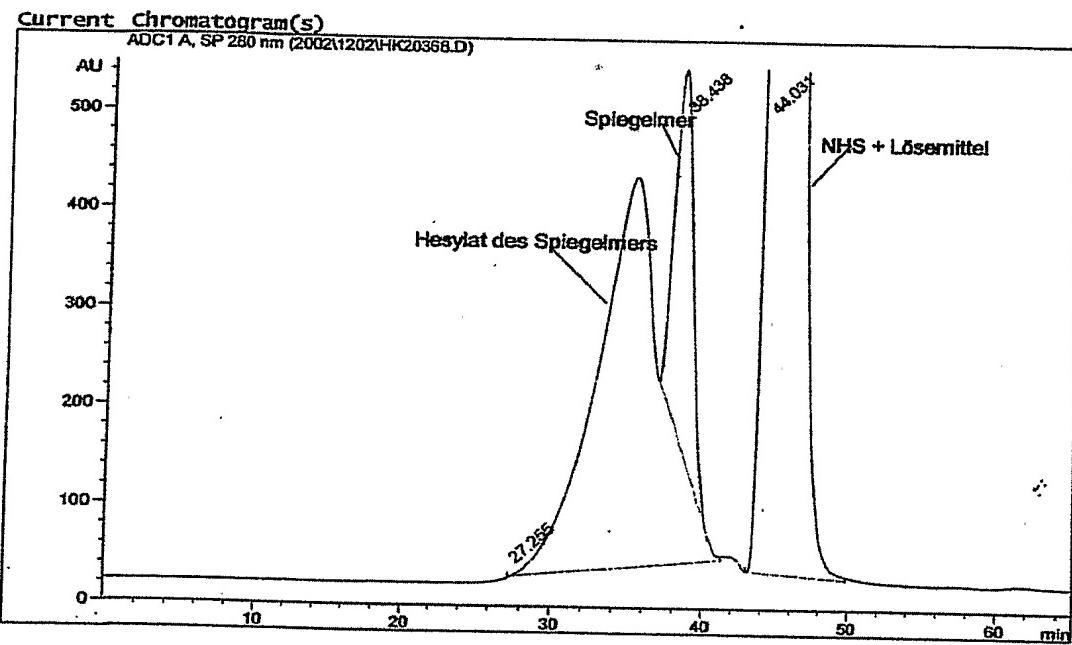


**B**

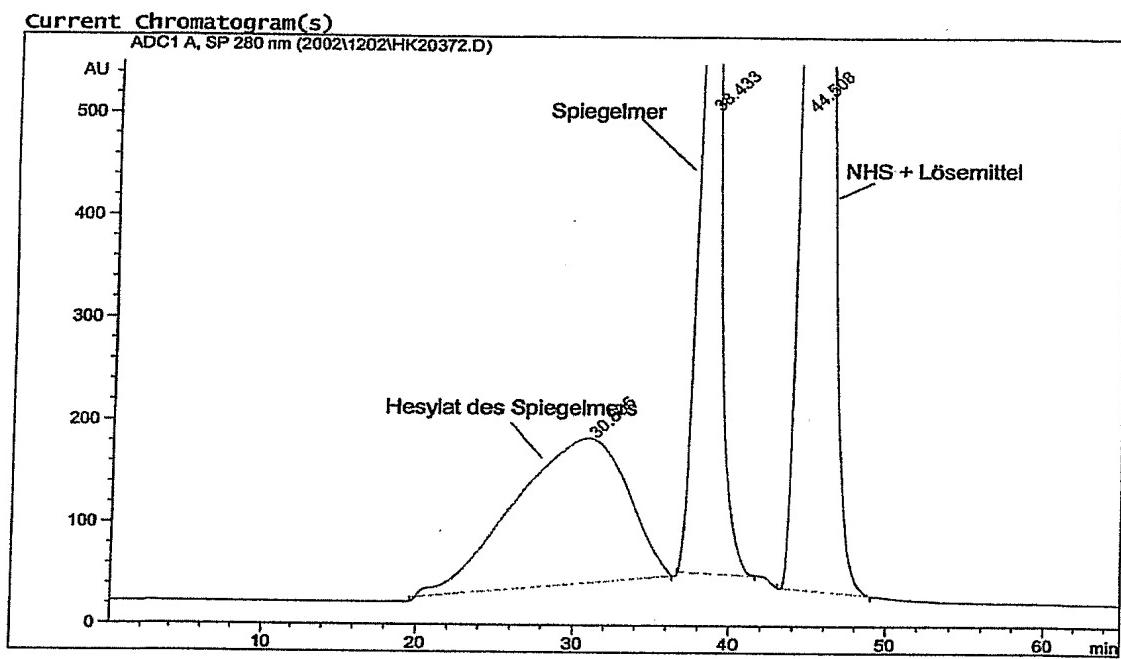


**Figur 1**

**A****B****C****D****E****Figur 2**



**Figur 3**



**Figur 4**

**Figur 5**

